



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین

دانشکده بهداشت

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بهداشت و ایمنی مواد غذایی

عنوان

**اثرات مخمر پروبیوتیک ساکارومایسز سرویزیه وارپته بولاردی بر بیان ژن‌های
حدت Soda، OmpA و بیان ژن‌های IL8، NF-kB در رده سلولی Caco-2
آلوده شده به باکتری پاتوژن غذازاد انتروباکتر ساکازاکی**

اساتید راهنما:

دکتر رزاق محمودی

دکتر علیرضا فراست

اساتید مشاور:

دکتر پیمان قجریگی

دکتر امیر پیمانی

نگارش:

سمانه الهیاری

شهریور ماه، ۱۳۹۹

چکیده

زمینه و هدف: اثرات ضد میکروبی مخمر پروبیوتیک ساکارومایسس بولاردی بر روی میکروب‌های مختلف، از طریق بسیاری از مطالعات به اثبات رسیده است. انتروباکتر ساکازاکی، میکروارگانیسمی فرصت طلب می‌باشد که در محصولات پودری فرآوری شده همانند شیرخشک به عنوان یک آلودگی ثانویه مطرح می‌باشد که می‌تواند سبب ایجاد بیماری‌های مختلفی از جمله: مننژیت، آبسه‌های مغزی، انتروکولیت نکرروزان، آنسفالیت، مننگوآنسفالیت نکرروز دهنده، باکتریی و سپسیس در نوزادان به ویژه در نوزادان نارس با وزن کم در هنگام تولد گردد. در این مطالعه، اثرات مخمر پروبیوتیک ساکارومایسس سرویزیه وارپته بولاردی بر بیان ژن‌های حدت *Soda*، *OmpA* و بیان ژن‌های *IL8*، *NF-κB* در رده سلولی CaCo2 آلوده شده به باکتری پاتوژن غذازاد انتروباکتر ساکازاکی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: رده سلولی CaCo2 پس از کشت در پلیت‌های ۹۶ و ۶ خانه مخصوص کشت سلول، به ترتیب برای آزمون *MTT*، تست اتصال و تهاجم باکتری و بیان ژن‌های *Soda*، *OmpA*، *IL8*، *NF-κB* استفاده شد. برای آزمون *MTT* ابتدا سل‌لاین CaCo2 را در پلیت‌های ۲۴ خانه به تعداد مشخص در چاهک کشت داده شد و سپس پلیت‌های حاوی سلول به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 انکوبه گردید. باکتری ساکازاکی و مخمر بولاردی آماده شده در محیط عفونی به هر چاهک اضافه شد و سپس به مدت ۱ و ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه و ۵ درصد CO2 انکوبه گردید پس از گذشت زمان مورد نظر چاهک‌ها ۳ بار توسط *PBS* شستشو داده شدند پس از آن محلول *MTT* به چاهک‌ها اضافه شده و برای مدت زمان ۳ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. پس از گذشت ۳ ساعت محلول *MTT* از چاهک‌ها خارج شده و به هر چاهک محلول *DMSO* اضافه گردید پس از گذشت ۱۰ دقیقه پلیت‌ها در ۶۰۰ نانومتر توسط دستگاه الیزابیدر خوانش شدند. برای آزمون تهاجم ابتدا رده سلولی CaCo2 را در پلیت‌های ۲۴ خانه به تعداد مشخص در چاهک کشت داده شد و سپس پلیت‌های حاوی سلول به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه و ۵ درصد CO2 انکوبه گردید. باکتری ساکازاکی آماده شده در محیط عفونی به هر چاهک اضافه شد و سپس به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه و ۵ درصد CO2 انکوبه گردید پس از گذشت زمان مورد نظر چاهک‌ها ۳ بار توسط *PBS* شستشو داده شد و ۰/۵ میلی لیتر محیط عفونی بدون باکتری به چاهک اضافه می‌گردد و سپس به میزان ۱۲۵ میکروگرم بر میلی لیتر جنتامایسین به هر چاهک اضافه می‌گردد و برای مدت زمان ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه و ۵ درصد CO2 انکوبه شد پس از گذشت زمان مورد نظر چاهک‌ها ۱ بار توسط *PBS* شستشو داده شد. پس از آن سلول‌ها لیز داده شد و با استفاده از *PBS* رقت سازی گردید و در محیط *TSA* به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه رشد داده شد و با استفاده از فرمول تهاجم میزان تهاجم باکتری به رده سلولی CaCo2 مشخص گردید. آزمون اتصال همانند آزمون تهاجم می‌باشد با تفاوت حذف مرحله جنتامایسین. آزمون بیان ژن نیز پس از استخراج *RNA* و ساخت *CDNA* و بررسی میزان کیفیت استخراج با استفاده از دستگاه نانودراپ و بر اساس پرایمرهای استخراج شده از مقالات برحسب دما و زمان‌های مشخص شده با استفاده از دستگاه *RotorgenQ* مورد بررسی قرار گرفته شد. داده‌های نتایج حاصل توسط آنالیز واریانس *ANOVA* با استفاده از نرم‌افزار آماری *SPSS* نسخه ۲۳ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: براساس نتایج بدست آمده در آزمون *MTT* اثر غیر سمی بودن مخمر پروبیوتیک بولاردی اثبات شد و همچنین اثر کشندگی باکتری بولاردی بر رده سلولی CaCo-2 اثبات شد. در آزمون اتصال و تهاجم درصد اتصال و تهاجم باکتری

ABSTRACT

Background and aim: Antimicrobial effects of *Saccharomyces boulardii* probiotic yeast have been investigated on a varied range of pathogens. *Enterobacter sakazaki*, an opportunistic pathogen, led to cross contamination in many dried powdered foods such as infant formula cause to different diseases e.g. meningitis, brain abscess, necrotizing enterocolitis, encephalitis, necrotizing meningoencephalitis, bacteremia, and sepsis especially in growth failure newborns with low birth weight. The aim of this study was investigation of effects of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* probiotic yeast on pathogen virulence factors gene expression including OmpA and Soda and infected Caco-2 cell line inflammation gene expression consisting of IL8 and NF- κ B encoding genes.

Materials and methods: After pellet formation of cell line on 96 and 6-well cell plates, caco-2 cells were analyzed by MTT assay and evaluated for gene expression of OmpA, Soda, IL8, and NF- κ B. Then, *S. boulardii* were added into any well with the same count. After 1 and 2 hours' treatment, infected and treated caco-2 cells were collected and investigated for gene expression and survival properties. For MTT assay, first cco-2 cells were cultured on 24-well microplates incubated at 37 °C for 48 hours with 5% CO₂. Then activated *C. sakazakii* and *S. boulardii* strains were added and inoculated into the cell medium culture containing caco-2 cells with the same conditions incubated for 1 and 2 hours. Then, all treated and control cells were washed triplicate by PBS and the MTT was added into each well. After 3 hours incubation with the same condition, medium of each well was renewed with DMSO then the absorbance was recorded at 600 nm by microplate reader. For invasion and attachment assay, each well contained infected cells were washed by PBS then counted on TSA for determination of the pathogens which attached to the cells after washing. Invasion assay was implemented using the same protocol with a different step including gentamycin treatment before washing to remove the attached cells then lysed to count the invaded pathogens into the caco-2 cells. After probiotic treatment, each well containing treated and infected cells after 1 and 2 hours were subjected to total RNA extraction and cDNA synthesis using commercial kits. Then, relative gene expression of each gene consisting of ompA, soda, IL-8 and NF- κ B were measured using specific primers, thermal cycling programs for each gene in RotorGen 6000 real-time PCR machine. Finally, all data were statistically analyzed by analysis of variance using SPSS software ver. 23.0.0.1; also all experiments and calculations were implemented in triplicate.

Results: The results showed that, *S. boulardii* probiotic yeast after 1 and 2 hours treatment significantly affect pathogen virulence factor gene expression including OmpA and Soda genes; also, it has been decreased the gene expression of inflammation encoding genes including IL8 and NF κ B after 1 and 2 hours treatment. Also, at the present study we showed that *C. sakazakii* were successfully attached and invaded into the caco-2 cells; consequently, the treatment should be considered practical against *C. sakazakii* gastrointestinal infections.

Conclusion: Consequently, the antimicrobial effect of *S. boulardii* has been approved on *E. sakazakii* caco-2 cell infection at the present study.

Keywords: *Saccharomyces Boulardii*, *Enterobacter Sakazakii*, Caco-2 Cells, Virulence Factor Genes, Inflammation Genes, Gene Expression



Qazvin university of Medical Sciences

Faculty of Health

A Thesis

Presented for the degree of Master of sciences

(M.Sc.) in Food Safety and Hygiene

Title:

The effects of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* probiotic yeast on Soda, OmpA, IL8, and NF- κ B gene expression in Caco-2 cells infected with *Enterobacter sakazakii* foodborne pathogen

Supervisor:

Razzagh Mahmoudi (Ph.D)

Ali Reza Farasat (Ph.D)

Adviser:

Peyman Ghajarbeygi (Ph.D)

Amir Peymani (Ph.D)

By:

Samaneh alahyari

September, 2020